

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (2) :200 - 210; 4 February 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.02.009

福州左海湖冬春季浮游细菌群落 16S rRNA 多样性

刘兰英^{1,2,3#}, 吕新^{1,2#}, 李巍^{1,2}, 陈丽华^{1,2}, 李玥仁^{1,2*}, 林碧娇^{1,2}

¹福建省农业科学院中心实验室, 福建 福州 350003

²精密仪器农业测试重点公共实验室, 福建 福州 350003

³福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350003

摘要:【目的】为揭示福州左海湖冬春不同季节水体中浮游细菌群落的多样性。【方法】通过对 2012 年 1 月 (冬季) 和 2012 年 4 月 (春季) 的左海湖水体样品构建细菌 16S rRNA 基因克隆文库, 对 2 个季节样品中细菌群落的多样性和均匀度等进行比较, 并对其群落结构特征进行分析。【结果】冬季左海细菌群落的多样性指数 Shannon-Wiener (H) 达到 3.53, 均匀度指数 (E) 达到 0.66; 春季细菌群落的多样性指数 Shannon-Wiener (H) 为 3.37, 均匀度指数 (E) 为 0.64, 这 2 个季节样品的细菌群落均具有很高的多样性, 但均匀度都偏低。2 个季节水体中共检测到 5 个细菌门类: α -变形菌纲 (α -proteobacteria)、 β -变形菌纲 (β -proteobacteria)、拟杆菌门 (bacteroidetes)、放线菌门 (actinobacteria)、蓝细菌门 (cyanobacteria), 此外还存在一些未被认知的序列。冬季的优势菌群为 β -proteobacteria, 次优势菌群为 cyanobacteria; 春季的最优势菌群为 cyanobacteria。【结论】左海湖水体细菌在冬春 2 季节中的菌群结构存在差异, 特别是最优势的细菌发生了很大变化, 其中冬季细菌群落的多样性及均匀度相对较高。

关键词:左海湖, 细菌多样性, 16S rRNA 基因克隆文库, 不同季节

中图分类号: Q938.8, X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2014) 02-0200-11

福州左海公园是福州市民主要休闲和娱乐场所之一, 位于福州市的西北部, 东与西湖公园相邻, 西依二环路, 北临铜盘路, 南靠象山。近年来, 随着经济和社会的快速发展, 我国的水环境污染日益严重, 左海湖也不例外。2008 年 6 月初, 福州左海公园湖水中出现了外表半透明果胶状, 形似水母, 近半米长, 重约五、六十公斤被称为“左海水怪”的不明生物体。

“左海水怪”的出现预示着水体生态环境发生

了某种程度的恶化。目前关于左海湖水体微生物的研究甚少, 尚未见到对该湖区水体细菌群落结构及多样性方面的研究报道。

微生物是水体生态环境中的一个重要组成部分, 水体中微生物群落的变化与其水质有着密切的联系^[1], 因此研究水体中微生物群落多样性对于深入了解水体环境的质量变化情况具有重要意义。过去对细菌的研究大多是建立在可培养基础之上, 但是大量微生物的不可培养性是传统微生物生态学在

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2011J01118)

* 通信作者。Tel: +86-591-87303167; E-mail: yuerenli@yahoo.com.cn

作者简介: #对本文有同等贡献。刘兰英 (1987 -), 女, 福建平潭人, 硕士研究生, 主要从事微生物生态学研究, E-mail: lly87119@126.com;

吕新 (1980 -), 男, 陕西汉中, 硕士研究生, 主要从事微生物生态学研究, E-mail: lux_ing@126.com

收稿日期: 2013-05-14; 修回日期: 2013-07-04

揭示自然界微生物群落结构、生态功能及其相互关系研究中的最大障碍^[2]。近年来,基于 PCR 技术的分子生物学方法在细菌研究中得到了广泛的应用,克服了传统微生物培养的局限性。16S rRNA 基因因其保守性和特异性,常被用作微生物分类系统研究的主要依据,用于细菌的分类鉴定^[3]。16S rRNA 基因文库的建立及其序列分析能够比较系统地揭示生态环境中原核微生物的多样性及其结构,已成为微生物分子生态学中用来研究各类环境中原核微生物群落组成结构的主要方法之一^[4-5]。

本文选择福州左海湖水体样品为研究对象,采用 16S rRNA 基因克隆文库法对冬春 2 个季节细菌群落组成及其多样性进行了研究和比较分析,以期对左海水体环境的保护和综合治理提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:本次实验在左海湖共设 4 个采样点,具体采样位置见表 1。分别于 2012 年 1 月份(样品标记为 A)和 4 月份(样品标记为 B) 2 次采集样品,每个采样点设 3 个重复,使用经酸浸泡、清洗干净的矿泉水瓶采集水深 20 cm 左右处水样 800 mL 左右。采样时对采样点水体的水温、pH 值、透明度、地理位置等相关指标进行测定。所有样品采集完成后立即放入带有冰块的保温箱中运回实验室,用于后续实验的分析。

表 1. 采样点分布

Table 1. Distribution of the sampling sites

sampling number	longitude	latitude
S1	26°5. 907'N	119°17. 175'E
S2	26°5. 885'N	119°17. 014'E
S3	26°5. 830'N	119°16. 951'E
S4	26°5. 876'N	119°16. 908'E

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR 扩增仪(Bio-Rad, 美国)、PCR 纯化试剂盒(生工,上海)、凝胶成像仪(柯达)、电泳仪(北京六一)、pMD19-T vector (TaKaRa, 大连)、*Hinf* I 限制性内切酶(TaKaRa, 大连)、*Csp6* I 限制性内切酶(TaKaRa, 大连)等。

1.2 水质理化指标及富营养化测定

pH 值用酸度计测定;透明度(SD)用透明度盘测定;叶绿素用 90% 丙酮萃取荧光分光光度法测

定^[6];总磷(TP)按 GB 11893—1989 测定;总氮(TN)、高锰酸钾指数(COD_{Mn})参照《水和废水监测分析方法》(第 4 版)^[7]进行测定。

采用修正的卡尔森营养状态指数(TSI_M)来评价研究区域的营养化类型,修正的卡尔森营养状态指数法采用 0—100 的一系列数字对湖泊营养状态分级, TSI 指数在 37 以下为贫营养,38—53 为中营养,54 以上为富营养^[8]。

$$TSI_M(Chla) = 10 \times (2.46 + \ln Chla / \ln 2.5)$$

$$TSI_M(SD) = 10 \times [2.46 + (3.69 - 1.53 \ln SD) / \ln 2.5]$$

$$TSI_M(TP) = 10 \times [2.46 + (6.71 + 1.15 \ln TP) / \ln 2.5]$$

$$TSI_M = [TSI_M(Chla) + TSI_M(SD) + TSI_M(TP)] / 3$$

式中 $TSI_M(Chla)$ 、 $TSI_M(SD)$ 、 $TSI_M(TP)$ 分别是以叶绿素 a、透明度、总 P 为基准的营养状态指数,Chla、SD、TP 分别为叶绿素 a 值(mg/L)、透明度(m)、总 P 浓度(mg/L)。

1.3 水体细菌的收集及样品总 DNA 的提取

将部分水样先用 8 μm 孔径的定性滤纸过滤以去除颗粒杂质以及真核生物,随后通过聚碳酸酯膜(0.2 μm, 47 mm, Whatman)真空抽滤,然后用无菌水冲洗 2 次,将滤膜取出剪成碎片,装入 1.5 mL 的离心管中, -70℃ 保存备用。将离心管在室温下解冻,之后参考 Wu 等^[9]的方法,提取浮游细菌样品的总基因组 DNA。

1.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及文库构建

PCR 扩增模板为上述纯化后的 DNA,引物为细菌通用的 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 扩增体系参照文献^[10]的方法进行。反应条件:95℃, 2 min;95℃, 1 min, 60℃, 1 min, 72℃, 90 s, 35 个循环;72℃, 30 min。反应结束后,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,目的条带在 1.5 kb 左右。如此扩增 5 管并混合 PCR 产物,以降低单次扩增的偏好性。

将混合后的 PCR 产物经凝胶回收纯化试剂盒(上海生工)纯化后连接至 pMD19-T 载体(TaKaRa 公司)上,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。以氨苄青霉素(100 μg/mL)抗性筛选阳性转化子,筛选出的阳性克隆子用 T 载体通用引物 M13F 和 M13R 对插

入的片段进行菌液 PCR, PCR 体系和条件同上, 选取 1.7kb 的克隆子进行下续的扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析 (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)。

1.5 ARDRA 分型和测序

将鉴定为阳性 PCR 产物的质粒 DNA 进行 ARDRA 分型分析, 用 *Hinf* I 和 *Csp6* I 限制性内切酶消化 (37℃) 质粒 DNA, 2.5% 琼脂糖凝胶成像鉴别各阳性克隆的酶切图谱类型, 据酶切图谱信息, 将酶切图谱完全一致的菌落划分为 1 个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)^[10], 统计操作分类单位的种类和各操作分类单位所含阳性克隆的数量, 将每一个 OTU 类型送 1 个克隆子到上海生工生物公司进行测序。

1.6 克隆文库分析

物种多样性与均匀度指数显示群落中种数多寡及个体分布情形。按照 Hill 等^[11]的方法对 ARDRA 所获得 OTU 结果进行群落多样性相关指标的统计分析, 计算 Shannon-Wiener 指数 (H')、Simpson 指数 (D) 和均匀度指数 (E)。Shannon-Wiener 和 Simpson 指数反映物种多样性, 其计算公式分别为:

$$H' = - \sum_{i=1}^s Pi \ln Pi$$

$$D = 1 / \ln Pi^2$$

其中 $Pi = ni/N$, Pi 表示第 i 个 OTU 在克隆文库中所占的比例, S 为克隆文库中总 OTU 种类数, ni 为第 i 种 OTU 的克隆数, N 为总克隆数。均匀度指数反映了群落中不同物种的多度分布的均匀程度, 其计算公式为 $E = H'/H_{max}$, H_{max} 为最大 Shannon 指数, 大小为 $\log_2 S$, S 为克隆文库中总 OTU 种类数。

文库的覆盖率, 用于评估所构建的文库对环境微生物多样性的体现程度, 其计算公式为 $C = (1 - n_1/N) \times 100\%$, n_1 代表在 16S rRNA 基因克隆文库中仅出现一次的 OTU 数量, N 为总克隆数^[10]。

1.7 系统进化分析

测序获得的 16S rRNA 基因序列与 BLAST 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 获得与每条序列相似性最高的序列, 在 GenBank 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 中进行 BLAST 同源性检索, 大于或者等于 97% 的视为同种^[12]。使用 CLUSTALX 1.81 工具进行多序列排列比对, 应用 MEGA 4.0^[13] (Neighbor-Joining 法) 构建系统进化树, Kimura 2-parameter 模式, Bootstrap 1000 次检测。

2 结果

2.1 理化指标分析

冬春 2 个季节各采样点的主要理化指标见表 2。由表 2 数据可以看出, 2 次采样时湖水的 pH 值范围均在 7-8 之间, 可见湖水水质是偏碱性的, 从 1 月份到 4 月份, 相同采样点的不同样品的许多理化指标呈现出较一致的变化。例如, 1 月份样品中的高锰酸钾指数 (COD_{Mn}) 和叶绿素 a 含量 (Chla) 普遍低于同采样点的 4 月份样品, 总氮含量 (TN) 和总磷含量 (TP) 也大多低于 4 月份样品, 而水体透明度 (SD) 大多高于 4 月份样品。各采样点的综合营养状态指数 (TSI) 均在 38-53 之间, 为中营养状况, 但相对于 1 月份, 4 月份的 TSI 指数较高, 说明 4 月份湖水的营养水平高于 1 月份。

表 2. 2012 年 1 月和 4 月左海各采样点水样理化值

Table 2. The physico-chemical characterization of water samples in each site in January and April, 2012

No.	pH	SD/ m	$c(COD_{Mn}) /$ (mg/L)	$c(TN) /$ (mg/L)	$c(TP) /$ (mg/L)	$c(Chla) /$ (mg/L)	TSI
1A	7.85	0.34	8.69 ± 1.16	0.409 ± 0.141	0.022 ± 0.001	0.030 ± 0.001	39.628
1B	7.39	0.40	8.81 ± 1.17	0.411 ± 0.033	0.037 ± 0.004	0.041 ± 0.002	42.060
2A	7.64	0.39	10.37 ± 1.30	0.521 ± 0.048	0.027 ± 0.005	0.023 ± 0.006	38.882
2B	7.34	0.36	10.51 ± 1.44	0.451 ± 0.133	0.036 ± 0.001	0.041 ± 0.008	42.605
3A	7.60	0.42	8.56 ± 1.14	0.431 ± 0.083	0.025 ± 0.002	0.029 ± 0.008	38.894
3B	7.36	0.40	8.67 ± 0.87	0.546 ± 0.118	0.043 ± 0.015	0.037 ± 0.002	42.357
4A	7.55	0.39	8.03 ± 2.32	0.656 ± 0.120	0.038 ± 0.002	0.009 ± 0.000	37.102
4B	7.27	0.32	8.14 ± 2.35	0.386 ± 0.155	0.034 ± 0.001	0.028 ± 0.000	41.620

2.2 16S rRNA 基因克隆文库构建及酶切分型分析

将冬、春 2 季各采样点水样的 16S rRNA 基因

PCR 扩增产物分别回收纯化后混合均匀, 连接至 pMD19-T 载体上, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。

PCR 鉴定后经统计,冬、春 2 季各获得了 85 和 93 个阳性克隆。

分别提取 2 个文库中阳性克隆子的质粒,应用限制性内切酶 *Hinf*I 和 *Csp*6I 进行酶切分型,每个 ARDRA

分型的结果作为一个 OTU。经统计,冬季和春季分别得到 40 和 39 种 OTU,最后共获得 58 个 OTU,编号为 OTU1 到 OTU58,58 个 OTU 在 2 个季节中所含克隆数及在各克隆文库中所占的比例见表 3。

表 3. 1 月份和 4 月份水样细菌 16S rRNA 基因克隆文库分析结果

Table 3. Data of bacterial 16S rRNA gene clone library of water samples constructed in January and April, 2012

OTU No.	closest relative in GenBank (accession number, similarity)	number of OTU (percentage)		group
		A	B	
OTU15	uncultured bacterium clone (EU234321.1, 99%)	3 (3.5%)	0	α -proteobacteria
OTU05	uncultured bacterium clone (EU234324.1, 94%)	1 (1.2%)	0	
OTU30	uncultured bacterium clone (JN941766.1, 99%)	2 (2.4%)	0	
OTU54	uncultured bacterium clone (FJ612416.1, 99%)	0	2 (2.2%)	
OTU02	uncultured bacterium clone (JF429269.1, 99%)	5 (5.9%)	2 (2.2%)	β -proteobacteria
OTU03	uncultured oxalobacteraceae bacterium (HE648211.1, 97%)	1 (1.2%)	1 (1.1%)	
OTU07	uncultured bacterium clone (EU800970.1, 99%)	4 (4.7%)	0	
OTU09	uncultured bacterium clone (JQ923666.1, 99%)	1 (1.2%)	0	
OTU38	uncultured β -proteobacterium clone (FJ916099.1, 96%)	0	1 (1.1%)	
OTU10	uncultured bacterium clone (JQ923666.1, 99%)	5 (5.9%)	0	
OTU11	uncultured β -proteobacterium clone (FN668033.2, 99%)	2 (2.4%)	0	
OTU12	uncultured bacterium clone (GU305753.1, 99%)	3 (3.5%)	0	
OTU16	uncultured bacterium clone (FJ820368.1, 99%)	2 (2.4%)	0	
OTU20	uncultured β -proteobacterium clone (DQ234182.2, 99%)	2 (2.4%)	0	
OTU21	uncultured bacterium clone (EU801949.1, 97%)	1 (1.2%)	0	
OTU23	uncultured β -proteobacterium clone (JN656904.1, 99%)	1 (1.2%)	0	
OTU24	uncultured bacterium clone (JF697484.1, 99%)	3 (3.5%)	1 (1.1%)	
OTU32	uncultured β -proteobacterium clone (JN038616.1, 99%)	1 (1.2%)	0	
OTU33	bacterium enrichment culture clone (JF830239.1, 97%)	4 (4.7%)	1 (1.1%)	
OTU35	uncultured beta proteobacterium clone (AF361203.1, 98%)	0	1 (1.1%)	
OTU51	uncultured β -proteobacterium clone (FJ916099.1, 99%)	2 (2.4%)	1 (1.1%)	
OTU29	uncultured bacteroidetes bacterium (AY947935.1, 96%)	1 (1.2%)	4 (4.3%)	bacteroidetes

OTU No.	closest relative in GenBank (accession number, similarity)	number of OTU (percentage)		group
		A	B	
OTU40	uncultured bacterium clone (JN232915.1, 94%)	2 (2.4%)	1 (1.1%)	
OTU45	uncultured bacterium clone (EF632932.1, 99%)	0	1 (1.1%)	
OTU08	<i>Cyanobium</i> sp. (AB610889.1, 99%)	2 (2.4%)	4 (4.3%)	cyanobacteria
OTU13	<i>Cyanobium</i> sp. (AB610892.1, 99%)	1 (1.2%)	3 (3.2%)	
OTU04	uncultured bacterium clone (JN032868.1, 99%)	2 (2.4%)	3 (3.2%)	
OTU22	<i>Cyanobium</i> sp. (AB610893.1, 98%)	1 (1.2%)	0	
OTU26	uncultured bacterium clone (HQ324868.1, 99%)	1 (1.2%)	5 (5.4%)	
OTU27	uncultured bacterium clone (HQ324868.1, 97%)	1 (1.2%)	0	
OTU37	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	3 (3.5%)	8 (8.6%)	
OTU34	uncultured bacterium clone (FJ820438.1, 98%)	2 (2.4%)	4 (4.3%)	
OTU41	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	0	3 (3.2%)	
OTU39	uncultured bacterium gene (AB154314.1, 99%)	0	1 (1.1%)	
OTU42	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	0	1 (1.1%)	
OTU36	<i>Cyanobium</i> sp. (AM710351.1, 99%)	0	8 (8.6%)	
OTU43	uncultured bacterium clone (GU305816.1, 99%)	0	1 (1.1%)	
OTU44	uncultured bacterium gene (AB154315.1, 99%)	0	1 (1.1%)	
OTU49	uncultured bacterium gene (AB154318.1, 99%)	0	1 (1.1%)	
OTU46	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	0	3 (3.2%)	
OTU50	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	2 (2.4%)	1 (1.1%)	
OTU52	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	0	1 (1.1%)	
OTU53	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	0	1 (1.1%)	
OTU57	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	0	1 (1.1%)	
OTU47	uncultured bacterium clone (JN869141.1, 93%)	0	1 (1.1%)	
OTU48	uncultured bacterium clone (FJ612238.1, 94%)	0	4 (4.3%)	
OTU58	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	0	7 (7.5%)	

续表 3

OTU No.	closest relative in GenBank (accession number, similarity)	number of OTU (percentage)		group
		A	B	
OTU55	uncultured bacterium clone (FJ612304.1, 99%)	2 (2.4%)	1 (1.1%)	
OTU28	bacterium enrichment culture clone (JF830199.1, 99%)	1 (1.2%)	6 (6.5%)	
OTU01	uncultured <i>actinobacterium</i> clone (EU117679.1, 99%)	5 (5.9%)	2 (2.2%)	actinobacteria
OTU06	uncultured <i>actinobacterium</i> clone (EU117721.1, 99%)	2 (2.4%)	2 (2.2%)	
OTU14	uncultured <i>actinobacterium</i> clone (FN668218.2, 94%)	2 (2.4%)	0	
OTU18	uncultured bacterium clone (HQ860608.1, 99%)	1 (1.2%)	0	
OTU31	uncultured <i>actinobacterium</i> clone (AJ575506.1, 99%)	1 (1.2%)	0	
OTU56	uncultured bacterium clone (FJ612194.1, 100%)	4 (4.7%)	1 (1.1%)	
OTU17	uncultured bacterium clone (EU703316.1, 96%)	1 (1.2%)	2 (2.2%)	unclassified bacteria
OTU25	uncultured bacterium clone (HM129219.1, 99%)	4 (4.7%)	1 (1.1%)	
OTU19	uncultured bacterium clone (HM129219.1, 99%)	1 (1.2%)	0	

2.3 多样性指数分析

分别计算 2 个文库的 Shannon-Wiener 指数 (H')、Simpson 指数 (D)、均匀度指数 (E) 和覆盖率 Coverage (C), 结果见表 4。从覆盖率 Coverage (C) 可以看出, 冬、春 2 季文库的覆盖率均较高, 能够较全面地反映细菌群落多样性, 因此其库容已足够。2

个文库的 Shannon-Wiener 指数 (H') 分别达到 3.53 和 3.37, 可见 2 个样品的细菌群落具有较高的多样性, 而在冬季, 水体细菌群落具有更为丰富的多样性。但是, 2 个文库的均匀度指数 (E) 都很低, 分别为 0.66 和 0.64, 说明这 2 个季节水体细菌种群的分布很不均匀。

表 4. 左海细菌 16S rRNA 基因克隆文库分析

Table 4. Analyses of 16S rRNA gene clone libraries of the bacteria in lake Zuohai

sample	clones	OTUs	coverage C /%	$H_{shannon}$	$H_{simpson}$	E
A	85	40	81.18	3.53	0.97	0.66
B	93	39	77.42	3.37	0.96	0.64

2.4 克隆文库分析

图 1 显示了细菌群落结构组成在 2 个克隆文库中的变化情况。α-变形菌纲 (α-proteobacteria)、β-变形菌纲 (β-proteobacteria)、拟杆菌门 (bacteroidetes)、放线菌门 (actinobacteria)、蓝细菌门 (cyanobacteria) 及一些未被认知的序列 (uncultured bacterium clone) 在 2 个文库中呈现不均衡分布。在 1 月份, β-proteobacteria 为最优势菌群, 其数量占总细菌数的 43.5%, cyanobacteria (21.2%) 和 actinobacteria

(17.6%) 分别位居第二和第三, 为次优势菌群; 与之相反的是, 在 4 月份, cyanobacteria (74.2%) 占了绝对的优势, β-proteobacteria 仅占 8.6%, actinobacteria 和 bacteroidetes 分别占了 5.4% 和 6.5%。很明显, 从 1 月份到 4 月份期间, β-proteobacteria 和 actinobacteria 的数量显著减少, 而 cyanobacteria 的数量却急剧上升。α-proteobacteria、bacteroidetes 和一些未被认知的序列 (uncultured bacterium clone) 在 2 个季节中所占的比例相对较小。

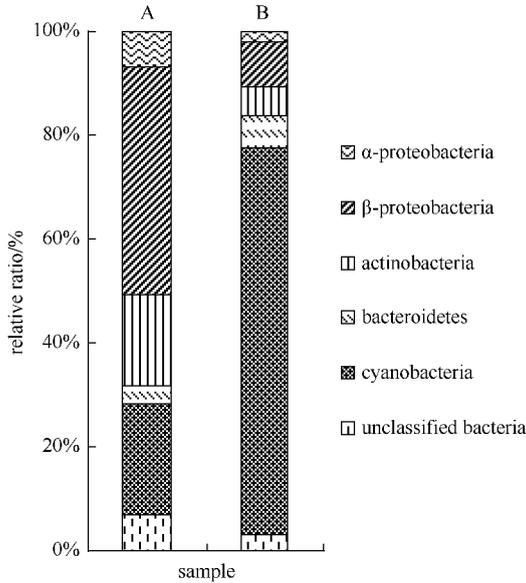


图 1. 16S rRNA 基因文库分析 1 月份和 4 月份水样细菌群落的组成

Figure 1. Bacterial community composition of the water samples during two seasons.

2.5 系统发育分析

从每个 OTU 类型中挑取 1 个克隆子进行测序, 测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 结果见表 3。所检测到的 58 条相似性序列中, 大多数来自于一些在太湖水体及其它淡水水体中普遍存在的菌群^[14-15]。以 NJ 法 (MEGA 4.0 软件) 对获得的序列构建系统发育树如图 2 所示。58 个 OTU 涵盖了 5 个细菌类群: α -变形菌纲 (α -proteobacteria)、 β -变形菌纲 (β -proteobacteria)、拟杆菌门 (bacteroidetes)、放线菌门 (actinobacteria) 及蓝细菌门 (cyanobacteria), 此外还存在一些未被认知的序列。所得序列与 GenBank 中序列同源性均在 93% - 100% 之间, 其中绝大多数同源性达到 95% 以上, 说明所获得序列与数据库中的序列具有极高的相似性。在 58 个 OTU 中, β -proteobacteria 和 cyanobacteria 为优势群落。 β -proteobacteria 序列共有 17 个, 占总测序序列的 29.3%; cyanobacteria 序列共有 25 个, 占总序列的 43.1%; actinobacteria 序列共有 6 个, 占 10.3%; 此外, α -proteobacteria 有 4 个序列, 占 6.9%; bacteroidetes 和一些未被认知的序列 (uncultured bacterium clone) 各占 5.2%。

3 讨论

本文采用构建 16S rRNA 基因克隆文库的方法, 分析了冬春 2 个季节 (2012 - 01、2012 - 04) 左海湖水体细菌群落结构组成及其多样性。尽管利用该技术不能反映样品中所有的细菌类群, 但该方法可以反映样品中主要的优势细菌类群^[16]。系统发育分析表明, 2 个季节水体中都检测到 5 个细菌门类: α -变形菌纲 (α -proteobacteria)、 β -变形菌纲 (β -proteobacteria)、拟杆菌门 (bacteroidetes)、放线菌门 (actinobacteria) 及蓝细菌门 (cyanobacteria), 说明左海湖已经形成了稳定的细菌群落。这与其它淡水生态系统典型类群一致。例如, Wu 等^[10]应用 16S rRNA 基因克隆文库技术对中国最大的淡水湖—鄱阳湖细菌群落多样性研究中报道, 该湖主要的细菌群落包括 proteobacteria, actinobacteria, bacteroidetes 及 cyanobacteria 等。Liu 等^[17]对东江流域细菌群落多样性研究中发现, 该流域主要的细菌群落有 α -proteobacteria, β -proteobacteria, γ -proteobacteria, actinobacteria, bacteroidetes 及 verrucomicrobia。这些研究均表明, β -proteobacteria 为淡水生态系统中最优势的细菌类群。本研究中, 左海湖水体优势类群为 β -proteobacteria 和 cyanobacteria, 这种差异可能主要受水质的影响, 4 月份水体环境比较特殊, 促使 cyanobacteria 占了绝对的优势。然而, Andrea 等^[18]在研究索瓦塔城市盐湖细菌多样性中指出, 该盐湖主要的细菌群落为 γ -proteobacteria, bacteroidetes 和 α -proteobacteria, 并且 γ -proteobacteria 是最优势的菌群。Du 等^[19]在报道中国南海细菌群落时空差异中表明, 春夏季南海主要细菌群落有 α -proteobacteria, cyanobacteria 和 γ -proteobacteria, 其中 α -proteobacteria 为最优势菌群, 而在冬季, cyanobacteria 为最优势细菌类群。由此可见, 淡水湖和盐湖环境中细菌群落的组成是不同的, 尤其是各自的优势菌群差异较大。

多样性指数分析说明, 2 个季节水体中的细菌多样性均十分丰富, 但 1 月份细菌多样性相对高些。其主要原因可能是, 1 月份是枯水期, 而 4 月份处于丰水期, 在此期间有大量的外来水流入左海湖, 从而富集了某些菌群, 降低了水体的细菌多样性。

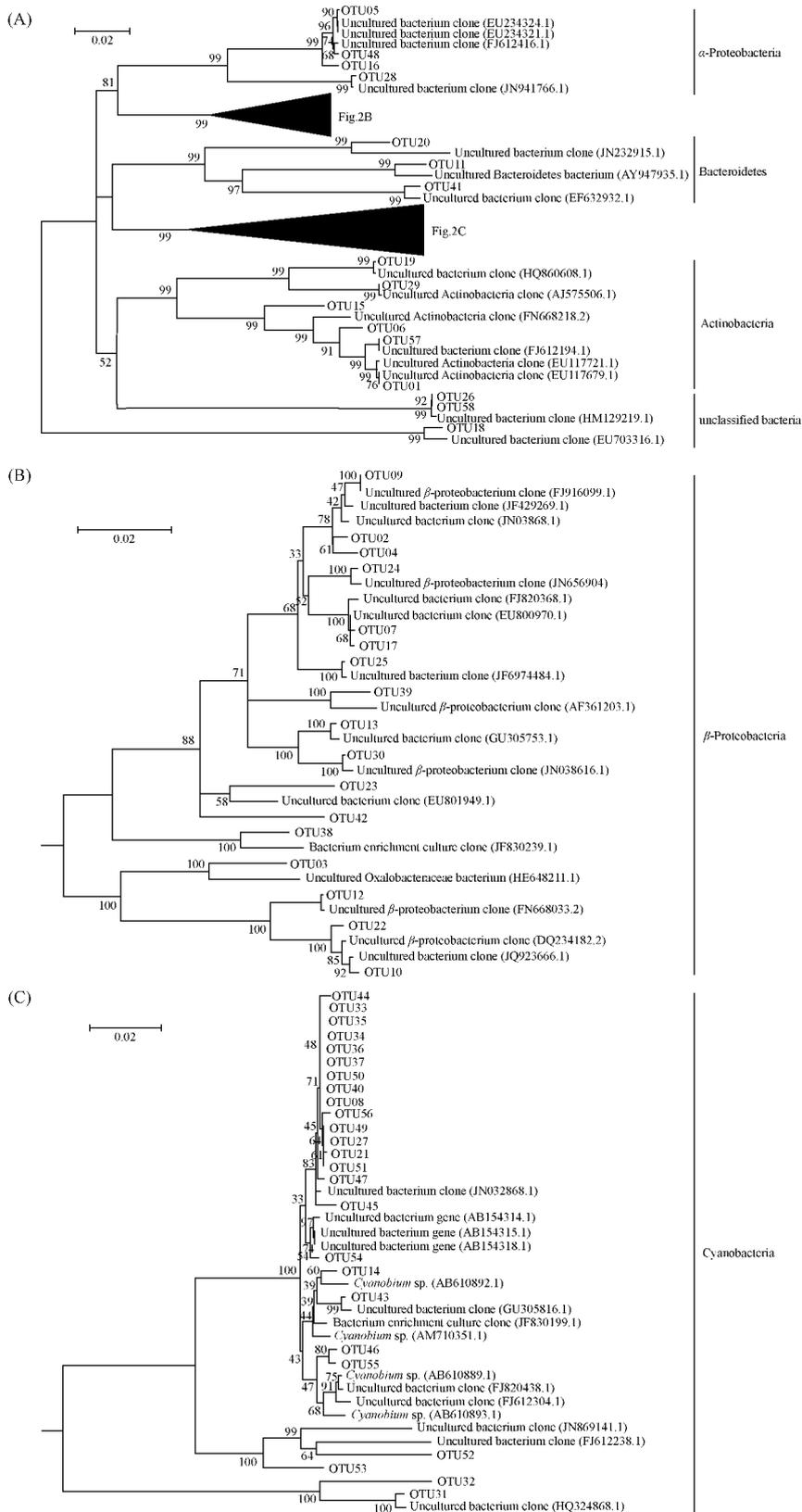


图 2. 16S rRNA 基因克隆文库的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of the obtained clones. Data in parentheses are the GenBank accession numbers. Numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. The scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position.

有研究指出,在碱性越低的湖泊环境中,cyanobacteria 数量总是越丰富^[20-23]。本研究发现,在冬春 2 季节,左海湖水均偏碱,其中冬季 4 个采样点的 pH 平均为 7.66,春季 pH 平均为 7.34,而 cyanobacteria 数量所占的比例分别为 21.2% 和 74.2%。可见,cyanobacteria 在 2 个季节中都占有很大的比例,春季左海湖水碱性更低,因此在春季 cyanobacteria 数量更丰富。

克隆文库分析显示,各细菌类群在 2 个季节中的分布存在很大差异,2 个季节没有共同的优势菌群。在冬季, β -proteobacteria (43.5%) 为优势菌群; cyanobacteria (21.2%) 和 actinobacteria (17.6%) 为次优势菌群;在春季, cyanobacteria (74.2%) 占了绝对优势,导致其他细菌类群数量减少,尤其是 β -proteobacteria,从冬季的 43.5% 剧降为春季的 8.6%。可见,在季节交替过程,最显著的变化是 β -proteobacteria 和 cyanobacteria 2 大类细菌菌群的分布情况。白洁^[24] 等在对黄海西北部沉积物细菌群落多样性研究中指出导致微生物多样性差异的重要原因可能是沉积环境的不同。李贺鹏^[25] 等在对崇明东滩天然湿地不同植被格局和剖面层次沉积物的理化性质和胞外酶活性的研究中指出丰富的有机营养可能促进特定菌类的富集,因而可能会限制其他很多种微生物的生长。本研究通过分析冬、春 2 季左海湖水体的理化指标发现,同一采样点不同季节水体的理化特性存在明显差异,尤其是 COD 高锰酸钾指数 (COD_{Mn}) 和叶绿素 a 含量 (Chla),春季 COD_{Mn} 和 Chla 浓度明显高于冬季(表 1)。可见,导致春季 cyanobacteria 占绝对优势而 β -proteobacteria 菌数量显著减少的可能原因是春季具有更为丰富的有机营养,还有较高的水体温度以及较强的光照强度等,导致 cyanobacteria 的富集,从而限制了 β -proteobacteria 的生长。此外,春季 Chla 浓度较高,说明春季藻类生物量较冬季丰富,水体污染较严重,亦可引起 cyanobacteria 数量偏多。这与文献报道中指出 cyanobacteria 为太湖梅梁湾水华爆发时期的优势物种^[14] 获得的结果一致。Tian 等^[26] 在研究南四湖不同水环境下 cyanobacteria 群落结构变化中表明,水质的变化对 cyanobacteria 菌的丰度会产生显著影响,水体温度和总磷浓度是重要的影响因素,而且温度影响更显著。本研究中,春季水温和总磷浓度明显高于冬季,这也可能是导致春季 cyanobacteria 菌数量偏多的原因之一。

有研究指出,bacteroidetes 菌数量的增加并伴随 α -proteobacteria 菌数量的降低甚至消失可作为水质下降的表现;反之,前者降低而后者增加可能预示水质的改善^[27]。本研究发现,bacteroidetes 和 α -proteobacteria 序列仅占总测序序列的 5.2% 和 6.9%,但是从 1 月份到 4 月份期间,左海湖水体 bacteroidetes 菌在总细菌类群中的比例由 3.5% 增加到 6.5%,而 α -proteobacteria 菌比例由 7.1% 降为 2.2%,可见从冬季过渡到春季,bacteroidetes 菌数量增加并伴随 α -proteobacteria 菌数量的降低。这表明,春季水环境质量较差,水体污染较严重,这与前面分析获得的结果是相一致的。值得一提的是, γ -proteobacteria 细菌在本研究中并没有检测到,有研究显示, γ -proteobacteria 多出现于沉积物中,如戴欣等^[28] 对太湖沉积物中可培养细菌的研究显示, γ -proteobacteria 为普通培养基中分离获得的最优势细菌。

本研究应用 16S rRNA 基因克隆文库技术,通过系统发育分析和多样性分析,首次对福州左海湖冬季和春季的水体细菌群落组成及多样性进行了研究,旨在阐明左海湖水体细菌群落结构及其季节变化,为进一步从微生物角度评价福州左海湖水质提供科学依据。但由于本研究只对冬春 2 季的细菌 16S rRNA 基因克隆文库进行了构建,对水体中其他微生物类群(如真菌)尚未涉及,还不能全面认识,需要进一步研究。

参考文献

- [1] Zhu J, Wang X, Zhai Z, Ma W, Li R, Wang X, Li Y. Changes of bacterial community structure on reusing domestic sewage of Daoxianghujing Hotel to landscape water. *Huan Jing Ke Xue*, 2010, 31 (5): 1299-1306. (in Chinese)
朱竞男, 王晓丹, 翟振华, 马文林, 李荣旗, 王雪莲, 李艳红. 稻香湖景酒店景观再生水生产中的细菌群落结构变化. *环境科学*, 2010, 31 (5): 1299-1306.
- [2] Liu W, Mao Z, Yang Y, Xie B. Analysis of soil bacterial diversity by using the 16S rRNA gene library. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (10): 1344-1350. (in Chinese)
刘玮琦, 茆振川, 杨宇红, 谢丙炎. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性. *微生物学报*, 2008, 48 (10): 1344-1350.
- [3] Liu C, Zuo W, Zhao Z, Qiu L. Bacterial diversity of different successional stage forest soils in Dinghushan. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (12): 1489-1496. (in Chinese)
柳春林, 左伟英, 赵增阳, 邱礼鸿. 鼎湖山不同演替

- 阶段森林土壤细菌多样性. 微生物学报, 2012, 52 (12): 1489-1496.
- [4] Wang X, Chen Z, Yuan H, Wu M, Wei W, Wu J, Qin H. Effect of long-term fertilization by the application of rice straw on bacterial diversity in paddy soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(13): 3865-3874. (in Chinese)
王霞, 陈哲, 袁红朝, 吴敏娜, 魏文学, 吴金水, 秦红灵. 应用 16S rDNA 克隆文库技术研究长期稻草还田对水稻土细菌多样性的影响. 生态学报, 2010, 30 (13): 3865-3874.
- [5] Zhao Z, Luo K, Chen G, Yang Y, Mao Z, Liu E, Xie B. Analysis of bacterial diversity in rhizosphere of cucumber in greenhouse by the methods of metagenomic end-random sequencing and 16S rDNA technology. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30 (14): 3849-3857. (in Chinese)
赵志祥, 罗坤, 陈国华, 杨宇红, 茆振川, 刘二明, 谢丙炎. 结合宏基因组末端随机测序和 16S rDNA 技术分析室温黄瓜根围土壤细菌多样性. 生态学报, 2010, 30(14): 3849-3857.
- [6] Yang C, Song X, Sun B. Comparison of simple methods for extraction and measurement of phytoplanktonic chlorophyll-a. *Marine Sciences*, 2007, 31 (1): 6-9. (in Chinese)
杨彩根, 宋学宏, 孙丙耀. 浮游植物叶绿素 a 含量简易测定方法的比较. 海洋科学, 2007, 31 (1): 6-9.
- [7] 王心芳, 魏复盛, 齐文启. 水和废水监测分析方法. 第 4 版. 北京: 中国环境出版社, 2002: 216-219.
- [8] Wang M, Liu X, Zhang J. Evaluate method and classification standard on lake eutrophication. *Environmental Monitoring in China*, 2002, 18 (5): 47-49. (in Chinese)
王明翠, 刘雪芹, 张建辉. 湖泊富营养化评价方法及分级标准. 中国环境监测, 2002, 18 (5): 47-49.
- [9] Wu QL, Zwart G, Schauer M, Kamst-van Agterveld MP, Hahn MW. Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (8): 5478-5485.
- [10] Wu L, Ge G, Zhu GF, Gong SJ, Li SG, Wan JB. Diversity and composition of the bacterial community of Poyang Lake (China) as determined by 16S rRNA gene sequence analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28 (1): 233-244.
- [11] Hill TC, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43 (1): 1-11.
- [12] Vancanneyt M, Neysens P, De Wachter M, Engelbeen K, Snauwaert C, Cleenwerck I, Van der Meulen R, Hoste B, Tsakalidou E, De Vuyst L. *Lactobacillus acidifarinae* sp. nov. and *Lactobacillus zymae* sp. nov., from wheat sourdoughs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55 (2): 615-620.
- [13] Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, 9 (4): 299-306.
- [14] Xi W, Wu X, Ye W, Yang H. Changes in bacterial community structure during preceding and degraded period of cyanobacterial bloom in a bay of the Taihu Lake. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2007, 13 (1): 97. (in Chinese)
奚万艳, 吴鑫, 叶文瑾, 杨虹. 太湖梅梁湾水域蓝藻水华前与水华末期细菌群落结构的变化术. 应用与环境生物学报, 2007, 13 (1): 97-103.
- [15] Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, Hagen F, Han S-K. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, 28 (2): 141-155.
- [16] Zheng Y, Hou L, Lu M, Liu M, Xie B, Li Y, Zhao H. The bacterial diversity in surface sediments from Chongming Eastern tidal flat in summer and winter. *China Environmental Science*, 2012, 32 (2): 300-310. (in Chinese)
郑艳玲, 侯立军, 陆敏, 刘敏, 谢冰, 李勇, 赵慧. 崇明东滩夏冬季表层沉积物细菌多样性研究. 中国环境科学, 2012, 32 (2): 300-310.
- [17] Liu ZH, Huang SB, Sun GP, Xu ZC, Xu MY. Phylogenetic diversity, composition and distribution of bacterioplankton community in the Dongjiang River, China. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80 (1): 30-44.
- [18] Borsodi AK, Felföldi T, Máthé I, Bognár V, Knáb M, Krett G, Jurecska L, Tóth EM, Máriaigetű K. Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities inhabiting the saline Lake Red located in Sovata, Romania. *Extremophiles*, 2013, 17 (1): 87-98.
- [19] Du JK, Xiao K, Li L, Ding X, Liu HL, Lu YJ, Zhou SN. Temporal and spatial diversity of bacterial communities in coastal waters of the South China Sea. *PLoS One*, 2013, 8 (6): e66968.
- [20] Ballot A, Krienitz L, Kotut K, Wiegand C, Metcalf JS, Codd GA, Pflugmacher S. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya—Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *Journal of Plankton Research*, 2004, 26 (8): 925-935.
- [21] Grant S, Grant WD, Jones BE, Kato C, Li L. Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles*, 1999, 3 (2): 139-145.
- [22] Imhoff JF, Süling J. The phylogenetic relationship among Ectothiorhodospiraceae: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses. *Archives of*

Microbiology, 1996, 165 (2) : 106-113.

- [23] Jones BE, Grant WD, Duckworth AW, Owenson GG. Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles*, 1998, 2 (3) : 191-200.
- [24] Bai J, Li H, Zhang J, Zhao Y. Diversity of bacterial community in the sediments of the Northern Yellow Sea. *China Environmental Science*, 2009, 29 (12) : 1277-1284. (in Chinese)
白洁, 李海艳, 张健, 赵阳国. 黄海西北部沉积物中细菌群落 16S rDNA 多样性解析. *中国环境科学*, 2009, 29(12) : 1277-1284.
- [25] 李贺鹏. 崇明东滩潮滩湿地沉积物理化因子与胞外酶的研究. 河北大学论文, 2004.
- [26] Tian C, Pei HY, Hu WR, Xie J. Variation of Cyanobacteria with different environmental conditions in Nansi Lake, China. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 8 : 1394-1402.
- [27] Sun X, Liu H, Feng F, Meng J, Li H. Diversity and phylogenetic analysis of planktonic bacteria in eutrophic zone of Lake Wuliangsuhai. *Biodiversity Science*, 2009, 17 (5) : 490-498. (in Chinese)
孙鑫鑫, 刘惠荣, 冯福应, 孟建宇, 李衡, 玛丽娜. 乌梁素海富营养化湖区浮游细菌多样性及系统发育分析. *生物多样性*. 2009, 17(5) : 490-498.
- [28] Dai X, Wang B, Huang Y, Zhang P, Liu S. Bacterial diversity in the sediments of Taihu Lake by using traditional nutrient medium and dilution nutrient medium. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45 (2) : 161-165. (in Chinese)
戴欣, 王保军, 黄燕, 张平, 刘双江. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性. *微生物学报*, 2005, 45(2) : 161-165.

Diversity of bacterioplankton community during winter and spring in the Lake Zuohai in Fuzhou

Lanying Liu^{1,2,3#}, Xin Lv^{1,2#}, Wei Li^{1,2}, Lihua Chen^{1,2}, Yueren Li^{1,2*}, Bijiao Lin^{1,2}

¹ Central Laboratory, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

² Key Laboratory for Precision Instrument Tests in Agricultural Fields, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

³ College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] To reveal the diversity of bacterioplankton during winter and spring in Zuohai lake, Fuzhou City, China. [Methods] We constructed 16S rRNA gene clone libraries in the two seasons (January, 2012 and April, 2012); the Shannon diversity index, Simpson dominance index and Evenness index of the bacterial community in the two samples were compared, and the analysis for the bacterial community structures of this two water samples was conducted. [Results] The Shannon diversity index in January achieved 3.53, and the Evenness index achieved 0.66; While the Shannon diversity index of April reached 3.37, and the Evenness index reached 0.64. It indicated that the bacterial communities in the two water samples were diverse, but the Evenness indexes were very low. Bacterial belonging to 5 phyla were identified: α -proteobacteria, β -proteobacteria, bacteroidetes, actinobacteria and cyanobacteria. Also, there were many sequences belonging to unidentified bacteria. In January, bacterial community with β -proteobacteria predominated followed by cyanobacteria; while cyanobacteria was the predominant bacterial communities in April. [Conclusion] The distribution of the bacteria in the two seasons has differences, especially the most dominant bacteria differed significantly. In addition, bacterial diversity in the two water samples was high, and compared with in spring, that in winter has higher bacterial diversity, but exit a large number of unidentified bacteria in this environment.

Keywords: the Lake Zuohai, bacterial diversity, 16S rRNA gene clone library, different seasons

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province of China (2011J01118)

* Corresponding author. Tel: +86-591-87303167; E-mail: yuerenli@yahoo.com.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 14 May 2013/Revised: 4 July 2013